

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 2000-270896  
(43) Date of publication of application : 03.10.2000

---

(51) Int. CI. C12Q 1/68  
C12M 1/00  
C12N 15/09  
G01N 33/566

---

(21) Application number : 11-019915 (71) Applicant : CANON INC  
(22) Date of filing : 28.01.1999 (72) Inventor : OKAMOTO HISASHI  
YAMAMOTO NOBUKO  
SUZUKI TOMOHIRO

---

(54) PROBE-BONDED SUBSTRATE, PRODUCTION OF PROBE-BONDED SUBSTRATE, PROBE ARRAY, DETECTION OF TARGET SUBSTANCE, METHOD FOR SPECIFYING BASE SEQUENCE OF SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID IN SAMPLE AND DETERMINATION OF TARGET SUBSTANCE IN SAMPLE

## (57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a probe-bonded substrate capable of quickly and economically carrying out nucleic acid analysis by bonding a probe specifically bondable to a target substance to the 1st position of the substrate and bonding a marker substance to the 2nd position capable of specifying the 1st position.  
SOLUTION: A liquid containing a probe specifically bondable to a target substance and having a 2nd functional group bondable to a 1st functional group supported on the surface of a substrate is supplied to the 1st position of the surface of the substrate to effect the bonding of the probe to the 1st position of the substrate surface. In the process for the production of a probe-bonded substrate containing the above procedure, a liquid containing a marker substance having a 3rd functional group directly or indirectly bondable to the 1st functional group is supplied to the 2nd position of the substrate surface to effect the bonding of the marker substance to the 2nd position of the substrate surface and obtain the objective probe-bonded substrate holding the marker substance bonded to the 2nd position capable of specifying the 1st position bonded with the probe specifically bondable to the target substance.

---

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) ; 1998, 2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-270896

(P2000-270896A)

(43)公開日 平成12年10月3日 (2000.10.3)

(51)Int.Cl.  
C 12 Q 1/68  
C 12 M 1/00  
C 12 N 15/09  
G 01 N 33/566

識別記号  
ZNA.

F I  
C 12 Q 1/68  
C 12 M 1/00  
G 01 N 33/566  
C 12 N 15/00

テマコト\*(参考)  
A 4 B 0 2 4  
A 4 B 0 2 9  
4 B 0 6 3  
Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数59 OL (全20頁)

(21)出願番号 特願平11-19915

(22)出願日 平成11年1月28日(1999.1.28)

(71)出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72)発明者 岡本 尚志

東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会社内

(72)発明者 山本 伸子

東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会社内

(74)代理人 100090538

弁理士 西山 恵三 (外2名)

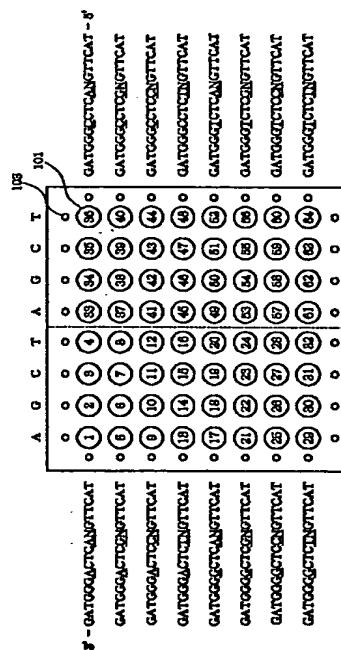
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プローブ結合基板、プローブ結合基板の製造方法、プローブアレイ、標的物質の検出方法、サンプル中の一本鎖核酸の塩基配列を特定する方法、及びサンプル中の標的物質の定量方法

(57)【要約】

【課題】 標的物質の検出や定量、標的核酸の塩基配列の特定等を迅速且つ安価に行なうことのできるプローブ結合基板の提供。

【解決手段】 標的物質に対して特異的に結合可能なプローブが基板表面の第1の位置に結合されているプローブ結合基板において、該第1の位置を特定可能な第2の位置にマーカー物質が結合されていることを特徴とするプローブ結合基板。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的物質に対して特異的に結合可能なプローブが基板表面の第1の位置に結合されているプローブ結合基板において、該第1の位置を特定可能な第2の位置にマーカー物質が結合されていることを特徴とするプローブ結合基板。

【請求項2】 該マーカー物質が色素である請求項1に記載のプローブ結合基板。

【請求項3】 該マーカー物質が蛍光性物質である請求項1に記載のプローブ結合基板。

【請求項4】 該マーカー物質が蛍光色素である請求項2に記載のプローブ結合基板。

【請求項5】 該プローブが一本鎖核酸である請求項1に記載のプローブ結合基板。

【請求項6】 該プローブが一本鎖DNAである請求項5に記載のプローブ結合基板。

【請求項7】 該プローブが一本鎖RNAである請求項5に記載のプローブ結合基板。

【請求項8】 該プローブが一本鎖PNA(ペプチド核酸)である請求項5に記載のプローブ結合基板。

【請求項9】 標的物質に対して特異的に結合可能であり、且つ基板表面が担持している第1の官能基に対して結合可能な第2の官能基を有するプローブを含む液を該基板表面の第1の位置に供給し、該プローブを該基板表面の第1の位置に結合させる工程を有するプローブ結合基板の製造方法において、該第1の官能基と直接若しくは間接的に結合可能な第3の官能基を有するマーカー物質を含む液を該基板表面の第2の位置に供給し、該マーカー物質を該基板表面の該第2の位置に結合させる工程を有し、該第2の位置が該第1の位置を特定可能な位置であることを特徴とするプローブ結合基板の製造方法。

【請求項10】 該マーカー物質が色素である請求項9に記載の製造方法。

【請求項11】 該マーカー物質が蛍光性物質である請求項9に記載の製造方法。

【請求項12】 該マーカー物質が蛍光色素である請求項10に記載の製造方法。

【請求項13】 該第1の官能基がマレイミド基であり、該第3の官能基がチオール基である請求項9記載の製造方法。

【請求項14】 該第1の官能基がチオール基であり、該第3の官能基がマレイミド基である請求項9記載の製造方法。

【請求項15】 該第1の官能基がスクシイミド基であり、該第3の官能基がアミノ基である請求項9に記載の製造方法。

【請求項16】 該第1の官能基がアミノ基であり、該第3の官能基がスクシイミド基である請求項9に記載の製造方法。

【請求項17】 該第1の官能基がイソシアネート基で

あり、該第3の官能基がアミノ基である請求項9に記載の製造方法。

【請求項18】 該第1の官能基がアミノ基であり、該第3の官能基がイソシアネート基である請求項9記載の製造方法。

【請求項19】 該第1の官能基がクロライド基であり、該第3の官能基が水酸基である請求項9記載の製造方法。

【請求項20】 該第1の官能基がエポキシ基であり、該第3の官能基がアミノ基である請求項9に記載の製造方法。

【請求項21】 該第1の官能基がカルボキシ基であり、該第3の官能基が水酸基である請求項9に記載の製造方法。

【請求項22】 該第1の官能基が水酸基であり、該第3の官能基がカルボキシ基である請求項9に記載の製造方法。

【請求項23】 該プローブが一本鎖核酸である請求項9に記載の製造方法。

【請求項24】 該プローブが一本鎖DNAである請求項23に記載の製造方法。

【請求項25】 該プローブが一本鎖RNAである請求項23に記載の製造方法。

【請求項26】 該プローブが一本鎖PNA(ペプチド核酸)である請求項23に記載の製造方法。

【請求項27】 該基板がガラス基板である請求項9に記載の製造方法。

【請求項28】 該基板が、該第1の官能基を一方の末端に有するシランカップリング剤を他方の末端で結合したガラス基板である請求項27に記載の製造方法。

【請求項29】 該第1の官能基がチオール基である請求項28に記載の製造方法。

【請求項30】 該第1の官能基がアミノ基である請求項28に記載の製造方法。

【請求項31】 該第1の官能基がイソシアネート基である請求項28に記載の製造方法。

【請求項32】 該第1の官能基がクロライド基である請求項28に記載の製造方法。

【請求項33】 該第1の官能基がエポキシ基である請求項28に記載の製造方法。

【請求項34】 該基板が、該第1の官能基を一方の末端に有するシランカップリング剤を他方の末端で結合したガラス基板であり、且つ該マーカー物質は、該第1の官能基と結合可能な第4の官能基を一端に有し、他端に該第3の官能基と結合可能な第5の官能基を有するリンカーモルヒド物質を介在して該基板の表面に結合している請求項27に記載の製造方法。

【請求項35】 該第1の官能基がアミノ基であり、該第4の官能基がスクシイミド基であり、該第5の官能基がマレイミド基であり、更に該第3の官能基がチオール

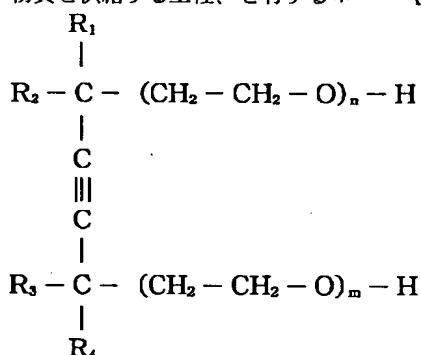
基である請求項34に記載の製造方法。

【請求項36】 該第3の官能基としてのチオール基が、該マーカー物質前駆体のアミノ基に、N-スクシイミジル-3-(2-ビリジルジチオ)プロピオネートを結合し、その後、形成されたジスルフィド(-SS-)を切断しチオール化することによって該マーカー物質に導入されたものである請求項35に記載の製造方法。

【請求項37】 該第1の官能基がチオール基であり、該第4の官能基がマレイミド基であり、該第5の官能基がスクシイミド基であり、該第3の官能基がアミノ基である請求項34に記載の製造方法。

【請求項38】 該リンカー物質が、N-(6-マレイミドカブロキシ)スクシイミドである請求項34に記載の製造方法。

【請求項39】 該リンカー物質を、一端に該第1の官能基を有する基板の、該マーカー物質が供給されるべき第2の位置に供給する工程；及び該リンカー物質が供給された位置に該マーカー物質を供給する工程、を有する\*



\* 請求項34記載の製造法方法。

【請求項40】 該マーカー物質の該基板表面への供給が該マーカー物質を含む液体をインクジェット法によって吐出させることによってなされる請求項9または39記載の製造方法。

【請求項41】 該インクジェット法がサーマルジェット法である請求項40に記載の製造方法。

【請求項42】 該インクジェット法がピエゾジェット法である請求項40に記載の製造方法。

【請求項43】 該マーカー物質を含む液体が、該液体全量に対して尿素を5~10wt%、グリセリンを5~10wt%、チオジグリコールを5~10wt%、及びアセチレンアルコールを1wt%含んでいる請求項40に記載の製造方法。

【請求項44】 該アセチレンアルコールが下記一般式Iで示される構造を有するものである請求項43に記載の製造方法。

【外1】

(I)

(上記式(I)中R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>は各々アルキル基を表わし、m及びnは各々整数を表わし、m=n=0、もしくは1≤m+n≤30であって、m+n=1の場合はmまたはnが0である。)

【請求項45】 該第1の官能基がマレイミド基であって、該第2の官能基がチオール基である請求項9記載の製造方法。

【請求項46】 該第1の官能基がエポキシ基であって、該第2の官能基がアミノ基である請求項9記載の製造方法。

【請求項47】 該プローブを含む液を基板表面への供給が該プローブを含む液体をインクジェット法によって吐出させることによってなされる請求項9記載の製造方法。

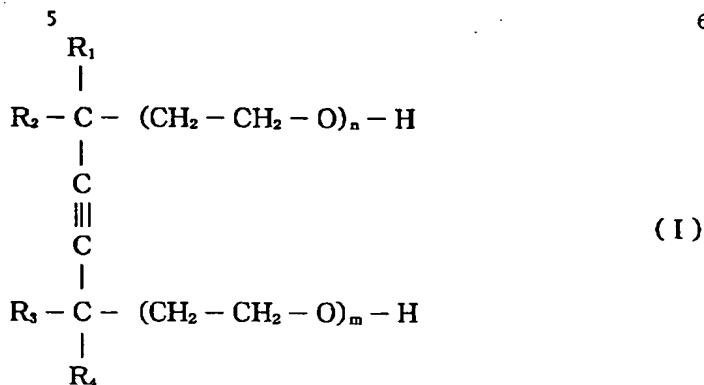
30 【請求項48】 該インクジェット法がサーマルジェット法である請求項47に記載の製造方法。

【請求項49】 該インクジェット法がピエゾジェット法である請求項47に記載の製造方法。

【請求項50】 該プローブを含む液体が、該液体に対し尿素を5~10wt%、グリセリンを5~10wt%、チオジグリコール5~10wt%、及びアセチレンアルコールを1wt%含んでいる請求項47記載の製造方法。

40 【請求項51】 該アセチレンアルコールが下記式(I)で示される構造を有するものである請求項50記載の製造方法。

【外2】



(上記式(I)中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及び  $R_4$  は各々アルキル基を表わし、 $m$  及び  $n$  は各々整数を表わし、 $m = n = 0$ 、もしくは  $1 \leq m + n \leq 30$  であって、 $m + n = 1$  の場合は  $m$  または  $n$  が 0 である。)

【請求項52】 基板表面の複数の位置に互いに独立しているプローブのスポットを有し、且つ該基板表面に該スポットの位置を特定可能な様にマーカー物質が付与されていることを特徴とするプローブアレイ。

【請求項53】 該マーカー物質が色素である請求項5 20 2に記載のプローブアレイ。

【請求項54】 該マーカー物質が蛍光性物質である請求項5 2に記載のプローブアレイ。

【請求項55】 該マーカー物質が蛍光色素である請求項5 3載のプローブアレイ。

【請求項56】 該スポットがマトリックス状の配置されており、該マーカー物質は該マトリックスの各行、及び各列を特定可能な位置に付与されている請求項5 2記載のプローブアレイ。

【請求項57】 サンプル中に含まれている可能性のある標的物質に対して特異的に結合するプローブを基板上に互いに独立した複数のスポットとして有し、且つ該基板表面に該スポットの位置を特定可能な様にマーカー物質が付与されているプローブアレイの各々のスポットと該サンプルとを接触させ、何れかのスポットにおける該プローブと該標的物質との反応物の有無を検出して該サンプル中の該標的物質の有無を検出する方法であって、該反応物の存在が検出された場合に、その反応物が存在するスポットの位置の、該基板表面の該マーカー物質の位置に基づいて特定する工程を有することを特徴とする標的物質の検出方法。

【請求項58】 サンプル中に含まれている一本鎖核酸の塩基配列を特定する方法であって、該一本鎖核酸の予想される複数の塩基配列の各々に対して相補的な塩基配列を有するプローブを基板上に互いに独立した複数のスポットとして有し、且つ該基板表面に該スポットの位置を特定可能な様にマーカー物質が付与されているプローブアレイの各々のスポットと該サンプルとを接触させる工程、及び該プローブと該標的物質との反応物が形成されたスポットの位置を該基板上のマーカー物質の位置に

基づき特定する工程、を有することを特徴とするサンプル中の一本鎖核酸の塩基配列の特定方法。

【請求項59】 請求項5 3に記載のプローブアレイを用いた、これらプローブに特異的に結合可能な標的物質の検出、定量方法を蛍光法により行うに際し、マーカー物質から発生する蛍光を標準の蛍光量とする標的物質の定量方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はプローブ結合基板の製造方法、プローブアレイ、標的物質の検出方法、及びサンプル中の一本鎖核酸の塩基配列を特定する方法、更にはサンプル中の標的物質の定量方法に関する。

##### 【0002】

【従来の技術】近年、固相プローブアレイを用いた標的物質の検出、定量に関する研究、開発が精力的に行われてきている。例えば、米国特許公報5,445,936にはフォトリソグラフィーを用いて作製された固相オリゴヌクレオチドアレイが示されている。一方、PCT公開公報WO 95/25116、米国特許公報5,688,642にはインクジェット法を用いた固相DNAプローブアレイの作製方法が示されている。ところでプローブアレイを用いて標的物質の検出や定量を行なう場合、該アレイを構成するプローブの内、どのプローブが標的物質と反応したのかを知ることが重要である。

##### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、各種方法によって作成されたプローブアレイを用いて標的物質の検出、定量等を行なう技術について検討を重ねてきた結果、以下のようなこれまでには認識されてこなかった新たな技術課題を見出すに至った。即ちプローブアレイがフォトリソグラフィーで作製されている場合には、基板の特定の位置に対する各プローブが占める位置を定めるのは比較的容易である。しかしインクジェット法による固相プローブアレイの作製においては、使用している装置（フォトリソグラフィーではマスクアライナーをしている）の違いで、基板の特定の位置に対する各プローブが占める位置を定めるのは上記フォトリソグラフィーによる方法に比較すると困難な場合がある。即ち、蛍光法

により標的物質の検出、定量を行う場合、各プローブが結合されたサイトのうちの全て、または十分の数のサイトが蛍光が発する状況であれば基板上での各プローブの相対位置を把握でき、それによって基板上の各サイトの位置の特定は比較的容易である。しかし、このような状況はどちらかといえばまれで、基板上のサイトのうち比較的少ない数のサイトからしか蛍光が観察されない場合が多い。この場合には各プローブの相対位置を知ることが困難で、どのプローブを結合したサイトが蛍光を発しているのかを特定することができない状況があり得る。このような問題は、例えば予めマトリクス状のパターンを基板上に形成しておくことである程度は解決できるが、このような基板の使用は、安価にプローブアレイを形成できるというインクジェット法を用いたプローブアレイの製法のメリットを相殺してしまうものであった。

【0004】本発明はかかる新たな技術課題の認定に基づきなされたものであって、その目的は標的物質の検出や定量、標的核酸の塩基配列の特定等を迅速且つ安価に行なうことのできるプローブ結合基板及びその製造方法を提供する点にある。

【0005】また本発明は、標的物質の検出や定量、標的核酸の塩基配列の特定等を迅速且つ安価に行なうことのできるプローブアレイを提供することを他の目的とする。

【0006】また本発明はサンプル中の標的物質を有無を迅速且つ安価に検出する方法を提供することを他の目的とする。

【0007】更に本発明はサンプル中に含まれる一本鎖核酸の塩基配列を迅速且つ安価に検出する方法を提供することを他の目的とする。

【0008】更にまた本発明は、サンプル中の標的物質を迅速かつ安価に定量する方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成することのできるプローブ結合基板は、標的物質に対して特異的に結合可能なプローブが基板表面の第1の位置に結合されているプローブ結合基板において、該第1の位置を特定可能な第2の位置にマーカー物質が結合されていることを特徴とする。

【0010】上記目的を達成することのできるプローブ結合基板の製造方法は、標的物質に対して特異的に結合可能であり、且つ基板表面が担持している第1の官能基に対して結合可能な第2の官能基を有するプローブを含む液を該基板表面の第1の位置に供給し、該プローブを該基板表面の第1の位置に結合させる工程を有するプローブ結合基板の製造方法において、該第1の官能基と直接若しくは間接的に結合可能な第3の官能基を有するマーカー物質を含む液を該基板表面の第2の位置に供給し、該マーカー物質を該基板表面の該第2の位置に結合

させる工程を有し、該第2の位置が該第1の位置を特定可能な位置であることを特徴とする。

【0011】上記目的を達成することのできるプローブアレイは、基板表面の複数の位置に互いに独立しているプローブのスポットを有し、且つ該基板表面に該スポットの位置を特定可能な様にマーカー物質が付与されていることを特徴とする。

【0012】上記目的を達成することのできる標的物質の検出方法は、サンプル中に含まれている可能性のある標的物質に対して特異的に結合するプローブを基板上に互いに独立した複数のスポットとして有し、且つ該基板表面に該スポットの位置を特定可能な様にマーカー物質が付与されているプローブアレイの各々のスポットと該サンプルとを接触させ、何れかのスポットにおける該プローブと該標的物質との反応物の有無を検出して該サンプル中の該標的物質の有無を検出する方法であって、該反応物の存在が検出された場合に、その反応物が存在するスポットの位置、該基板表面の該マーカー物質の位置に基づいて特定する工程を有することを特徴とする。

【0013】上記目的を達成することのできるサンプル中の一本鎖核酸の塩基配列の特定方法は、サンプル中に含まれている一本鎖核酸の塩基配列を特定する方法であって、該一本鎖核酸の予想される複数の塩基配列の各々に対して相補的な塩基配列を有するプローブを基板上に互いに独立した複数のスポットとして有し、且つ該基板表面に該スポットの位置を特定可能な様にマーカー物質が付与されているプローブアレイの各々のスポットと該サンプルとを接触させる工程、及び該プローブと該標的物質との反応物が形成されたスポットの位置を該基板上のマーカー物質の位置に基づき特定する工程、を有することを特徴とする。

【0014】また上記目的を達成することのできる標的物質の定量方法は、基板表面の複数の位置に互いに独立しているプローブのスポットを有し、且つ該基板表面に該スポットの位置を特定可能な様にマーカー物質が付与されているプローブアレイを用いた、これらプローブに特異的に結合可能な標的物質の検出、定量方法を蛍光法により行なうに際し、マーカー物質から発生する蛍光を標準の蛍光量とすることを特徴とする。

【0015】この様な発明によれば、ウェル等を表面に有しない、平坦な基板上にインクジェット法を用いてプローブをスポット状に高密度に配置した場合であっても、各プローブのスポットの位置の特定を迅速、且つ正確に行なうことができる。

【0016】

【発明の実施の形態】以下に本発明を図面を用いて詳細に説明する。

【0017】図1は基板上に複数個の互いに塩基配列の異なるプローブをスポット状に結合させたプローブアレイの平面図である。101はプローブのスポット、そし

て103はマーカー物質のスポットであって、該プローブのスポット101の位置を特定可能な位置に配置されている。具体的には、マトリクス状に配置されているプローブのスポット101の各行及び各列に対応する位置に配置されており、それによってスポット101の位置の特定を可能としているものである（なお各プローブのスポット内部の数字は、後述する実施例の説明に用いるのが便宜的なものである）。

【0018】そしてマーカー物質のスポット103は、例えばマーカー物質を含む液体を該基板上に、例えばインクジェット法を用いて付与することによって形成可能である。またプローブのスポット101もまた同様にプローブを含む液体をインクジェット法を用いて付与することによって形成可能である。そしてマーカー物質のスポット103のインクジェット法による形成を、プローブのスポット101のインクジェット法による形成と同一の工程で行なうことで、プローブのスポットの行または列とマーカー物質のスポット103との間での位置ずれが生じることを防ぐことができ好ましい。

【0019】（マーカー物質について）マーカー物質として用い得る物質としては、基板上に付与せしめた状態で検出可能な情報（例えば蛍光等）を発するものであれば特に限定されるものでないが、例えば色素を用いた場合、該マーカー物質のスポットは光学顕微鏡で検出可能であり、好適である。また、固相プローブアレイでの標的物質の検出は蛍光標識物質により行なうことが多く、そうした意味でいえば、マーカー物質が蛍光性物質であれば、標的物質の検出と同時に、同じ装置によりマーカー物質が検出できて都合がよい。蛍光色素は蛍光物質としては一般的で、例えば、標的物質の検出時に用いられる標識物質と、同じ骨格を有する蛍光色素をマーカー物質として用いれば、例えば、蛍光顕微鏡を用いて、同時に観察できるという利点もある。逆に異なる色素を用いれば、標的物質の検出の際の妨げになる可能性を防止できる。具体的に本発明に用いることのできるマーカー化合物としては例えばフルオロセイン、ローダミンB、テトラメチルローダミン、ローダミンX、テキサスレッド、CY5等が挙げられる。

【0020】ところでマーカー物質は、単に基板上に付着させただけでも良いが、プローブアレイを標的物質と反応させた後に洗浄等を施す場合があることを考慮すると、洗浄等でマーカー物質が除去されることがないようにマーカー物質を基板上に化学的に結合させておくことが好ましい。基板にマーカー物質を結合させる方法に関しては特に限定ではなく、どのような手法でも用いることができる。そして上記したようにマーカー物質をインクジェット法で基板に付与する場合、該マーカー物質を含む液体が基板に付与された時点で速やかに基板とマーカー物質との間に化学的な結合が形成される様にマーカー物質と基板表面との各々に互いに反応性の高い官能基を導入

しておくことは好ましい態様である。以下に基板の官能基とマーカー物質の官能基の組み合わせの例をあげる。

【0021】（1）基板の表面の官能基がマレイミド基であり、マーカー物質の有する官能基がチオール基。

（2）基板の表面の官能基がチオール基であり、マーカー物質の有する官能基がマレイミド基。

（3）基板の表面の官能基がスクシイミド基であり、マーカー物質の有する官能基がアミノ基。

（4）基板の表面の官能基がアミノ基であり、マーカー物質の有する官能基がスクシイミド基。

（5）基板の表面の官能基がイソシアネート基であり、マーカー物質の有する官能基がアミノ基。

（6）基板の表面の官能基がアミノ基であり、マーカー物質の有する官能基がイソシアネート基。

（7）基板の表面の官能基がクロライド基であり、マーカー物質の有する官能基が水酸基。

（8）基板の表面の官能基がエポキシ基であり、マーカー物質の有する官能基がアミノ基。

（9）基板の表面の官能基がカルボキシ基であり、マーカー物質の有する官能基が水酸基。

（10）基板の表面の官能基が水酸基であり、マーカー物質の有する官能基がカルボキシ基。

【0022】これらの組合せの中から、マーカー物質に用いる具体的な化合物の構造、及び基板材質等を考慮して適宜選択すればよい。

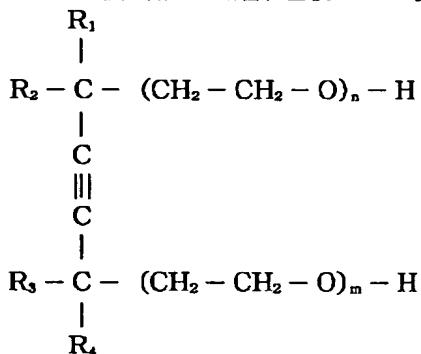
【0023】（固相基板）基板は、プローブとマーカー物質が結合可能で、かつ、標的物質の検出を妨げるものでなければ特に限定されるものではないが、ひとつの例としてガラス基板があげられる。その他、シリコン基板、金属基板、樹脂基板等、また、適当な表面処理をしたそれぞれの基板でも構わない。ガラス基板を基板として使用する場合には、洗浄方法、表面処理等の方法が各種知られているし、また、基板自体が入手しやすい等の利点があり好適である。ガラス基板の表面に官能基を導入する方法として、例えば、各種表面処理により水酸基、カルボキシル基等を導入して、それらの官能基をそのまま使用する方法がある。また、ガラス基板を各種の官能基が結合したシランカップリング剤で処理して、その官能基を利用してよい。市販されているシランカップリング剤の官能基としては、チオール（SH）基、アミノ基、イソシアネート基、クロライド基、エポキシ基等があり、プローブ、マーカー物質の基板に結合に関与する官能基として上記シランカップリング剤の官能基と結合可能なものを適宜選択して利用することができる。

シランカップリング剤による処理法は一般的に良く知られているので、詳しくは触れないが、上記官能基を有するシランカップリング剤は、信越化学工業株式会社、日本ユニカ株式会社から市販されているのでそれらを利用すれば良い。

【0024】（インクジェット液組成）ところで、上記

したような基板にマーカー物質を付与する手段としては、上述の用に様々な方法を例にあげることができるが、微量液滴（数p1～数10n1）を吐出することが可能なインクジェット法が適している。現在、実用化されているインクジェット法には、ピエゾ素子を用いたピエゾジェット法、また、サーマル素子を用いたサーマルジェット法があるが、本発明にはいずれの方法を用いても良い。ところで、上記した様な基板上にインクジェット法によってマーカー物質を付与する場合、基板上で必要に液滴が広がることなく、所定の箇所にとどまる様に液組成を調製することが好ましい。そしてその液組成は、該マーカー物質本来の性能を損なわず、また該マーカー物質に導入した、基板表面の官能基との反応性を損なうようなものでないことが好ましい。

【0025】またインクジェット法を用いる場合、基板\*



(I)

【0027】上記式(I)中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>は各々アルキル基、具体的には例えば炭素数1～4の直鎖状若しくは分歧鎖状のアルキル基を表わし、m及びnは各々整数を表わし、m=n=0、もしくは1≤m+n≤30であって、m+n=1の場合はmまたはnが0である。

【0028】(プローブ) 本発明で用いられるプローブは標的物質と特異的に結合するものであって、必要に応じて標的物質との結合したことを検出するための標識が結合されていてもよい。そしてプローブとして用いられる代表的なものの一つとしては例えば、一本鎖核酸を挙げることができ、一本鎖核酸としては例えば一本鎖DNA、一本鎖RNA、一本鎖PNA(ペプチド核酸)を例にあげることができる。そしてこのようなプローブは従来公知のものを標識物質の種類に応じて適宜選択して用いればよい。ところでこのプローブは、前記したマーカー物質の場合と同様に、プローブと基板との双方に互いに反応する官能基を導入し、基板に確実に結合されるような構成とすることもまた本発明の範囲内のものである。そしてプローブと基板とに導入可能な官能基の組合わせとしては、例えばアミノ基(プローブ側)とエポキシ基(基板側)、チオール基(プローブ側)とマレイミド基(基板側)等が挙げられる。

【0029】(SH基とマレイミド基) 好ましい例とし

\*表面に供給される液滴が微小であるので、供給後蒸発乾燥してしまうことを防ぐ為に、反応中には保湿容器のような反応容器に基板を保存しておくことは好ましい方法であるが、吐出する液体に保湿剤を含ませておく方法も有効である。特にサーマルジェット法においては、吐出時に温度上昇をともなうので、保湿成分、表面張力調製成分の存在は重要である。そのようなマーカー物質、あるいは、プローブを基板表面に供給する溶媒としては、尿素を5～10wt%、グリセリンを5～10wt%、チオジグリコールを5～10wt%、及び、アセチレンアルコールを1wt%を含んでいるものを好適に用いることができる。アセチレンアルコールは一般式Iで示される構造を有するものである。

【0026】

【外3】

ては例えば、マレイミド基とチオール(-SH)基との組合せを用いる例が挙げられる。即ち核酸プローブの末端にチオール(-SH)基を結合させておき、固相表面がマレイミド基を有するように処理しておくことで、固相表面に供給された核酸プローブのチオール基と固相表面のマレイミド基とが反応して核酸プローブを固定化し、その結果核酸プローブのスポットを固相上の所定の位置に形成することができる。特に末端にチオール基を有する核酸プローブを上記した組成の液体に溶解させたものをバブルジェットヘッドを用いてマレイミド基を導入した固相表面に付与した場合、核酸プローブ溶液は固相上に極めて小さなスポットを形成する。その結果、核酸プローブの小さなスポットを固相表面の所定の位置に形成することができる。この場合、固相表面に例えば親水性及び疎水性のマトリクスからなるウェルを形成し、スポット間の連結を防止する様な構成を予め設けておく必要性は認められない。

【0030】例えば塩基長18merの核酸プローブを濃度8μMで含む、粘度や表面張力が前記した範囲内となるよう調整した液体を、バブルジェットプリンタ(商品名:BJC620; キヤノン(株)社製、但し平板に印字可能に改造したもの)を用いて、固相とバブルジェットヘッドのノズルの間隔を1.2～1.5mm程度に設定し、該ノズルから吐出させた場合(吐出量は約

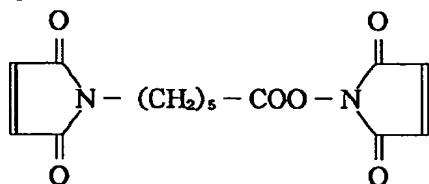
24ピコリットル)、固相上には直径約70~100μm程度のスポットを形成することができ、また液体が固相表面に着弾したときの飛沫に由来するスポット(以降「サテライトスポット」と称する)は目視では全く認められなかった。該固相上のマレイミド基と核酸プローブ末端のSH基との反応は、吐出される液体の条件にもよるが、室温(25°C)下で30分程度で完了する。なおこの時間は液体の吐出にピエゾジェットヘッドを用いた場合と比較して短い。その理由は明らかでないが、パブルジェット法ではその原理によりヘッド内の核酸プローブを含む液体の温度が上昇し、その結果マレイミド基とチオール基の反応効率が上昇して反応時間が短縮されるものと考えられる。

【0031】なお、マレイミド基とチオール基との組合せを用いる場合、核酸プローブを含む溶液にチオジグリコールを含有させることができると好ましい。チオール基は中性及び弱アルカリ性条件下ではジスルフィド結合(-S-S-)を形成し、二量体となることがある。しかし、チオジグリコールを加えることで、二量体形成によるチオール基とマレイミド基との反応性の低下を防ぐことができる。

【0032】固相表面へのマレイミド基の導入方法としては、種々の方法が利用できるが、例えばガラス基板にアミノシランカップリング剤を反応させ、次にそのアミノ基と下記構造式で示されるN-(6-マレイミドカブロイロキシ)スクシイミド(N-(6-Maleimidocaproyloxyl) succinimide)を含む試薬(EMCS試薬:Dōjindo社製)とを反応させることで可能である。

【0033】

【外4】



【0034】またチオール基が結合した核酸プローブは、例えばDNA自動合成機を用いてDNAを自動合成する際に5'末端の試薬として5'-Thiol-Moddifier C6(Glen Research社製)を用いる事により合成することができ、通常の脱保護反応の後、高速液体クロマトグラフィーにより精製することで得られる。

【0035】(アミノ基とエポキシ基)固定化に利用する官能基の組合せとしては、上記したチオール基とマレイミド基の組合せ以外にも、例えばエポキシ基(固相上)とアミノ基(核酸プローブ末端)の組合せ等が挙げられる。固相表面へのエポキシ基の導入は、例えばエポキシ基を有するポリグリシルメタクリレートを樹脂からなる固相表面に塗布したり、エポキシ基を有する

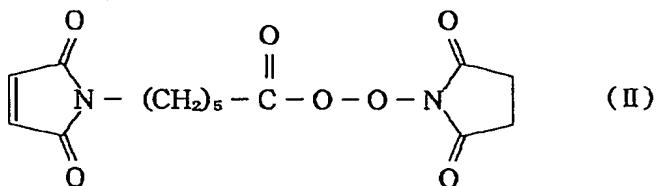
シランカップリング剤をガラス製の固相表面に塗布してガラスと反応させる方法等が挙げられる。

【0036】上記したように固相表面と一本鎖核酸プローブの末端とに互いに反応して共有結合を形成するような官能基を導入した場合、該核酸プローブと固相とがより強固に結合される。また該核酸プローブの固相との結合部位を常に末端とすることができる為、各々のスポットでの核酸プローブの状態を均一にすることができる。その結果各々のスポットにおける核酸プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションの条件が揃うこととなり、より一層精度の向上した標的核酸の検出や塩基配列の特定が可能となるものと考えられる。更に末端に官能基のついた核酸プローブと固相とを共有結合させる事は、非共有結合(例えば静電的な結合等)によって固相上に固定した核酸プローブに比べ、配列や長さの違いによるプローブDNAの結合量の差を生じることなく定量的にプローブアレイを作製できる。更にまた核酸の塩基配列部分が全てハイブリダイゼーション反応に寄与する為、ハイブリダイゼーション反応の効率を著しく上昇させる事ができる。また一本鎖核酸プローブの標的核酸とのハイブリダイゼーションに関与する部分と固相との反応に関与する官能基との間にリンカー部分として例えば炭素数1~7程度のアルキレン基を導入しても良い。これによって固相に核酸プローブを結合させたときに該固相表面と該核酸プローブとの間に所定の距離を設けることができ、核酸プローブと標的核酸との反応効率のより一層の向上が期待できる。

【0037】(リンカー)また、標的物質の検出を効果的にする等の目的のために、基板とプローブの距離を変化させるため、また、基板とプローブの官能基の選択肢を広げるために、基板とプローブの間に適当なリンカー物質を挿入しても良く、その際には当然のことながら、基板とマーカー物質の間にもリンカー物質が挿入されることになる。そのような方法の代表例は、シランカップリング剤のリンカー物質と結合する官能基がアミノ基であり、リンカー物質の第一の末端の官能基がスクシイミド基であり、第二の末端の官能基がマレイミド基であり、マーカー物質の官能基がチオール基である場合、また、シランカップリング剤のリンカー物質と結合する官能基がチオール基であり、リンカー物質の第一の末端の官能基がマレイミド基であり、第二の末端の官能基がスクシイミド基であり、マーカー物質の官能基がアミノ基である場合をあげることができる。このような場合には当然のことながら、シランカップリング剤の官能基とリンカー物質の第一の末端の官能基が反応して結合し、また、マーカー物質の官能基とリンカー物質の第二の末端の官能基が反応して結合することになる。

【0038】上記二例に用いられるリンカー物質としては、片方の末端としてアミノ基と結合可能なスクシイミド基、他方の末端としてチオール基と結合可能なマレイ

ミド基を有している物質を例としてあげることができ。そのような物質は、シグマアルドリッヂャパン社、同仁化学株式会社から複数市販されているので、それらを使用すればよいが、スクシイミド基、マレイミド基共に加水分解されやすい官能基であるので、可能な限り、分解速度が遅い物質が望ましく、市販されているも\*



【0040】本発明では固相基板のプローブ、あるいは、マーカー物質に結合可能な官能基としてチオール基と選択的に反応するマレイミド基をひとつの例としてあげているが、マーカー物質として、例えば、蛍光色素を用いる場合、チオール基を有している蛍光色素で市販されているものは皆無である。そのような場合には市販されている蛍光色素を適宜化学修飾して用いることができる。例えば、アミノ基を結合した蛍光色素は数多く知られており、市販されている。このアミノ基にN-スクシイミジル-3-(2ビリジルジチオ)プロピオネート (SPDP)※

\* ののなかでは、N-(6-マレイミドカブロキシ)スクシイミド (EMCS 化合物 I I ) が望ましい例としてあげることができる。

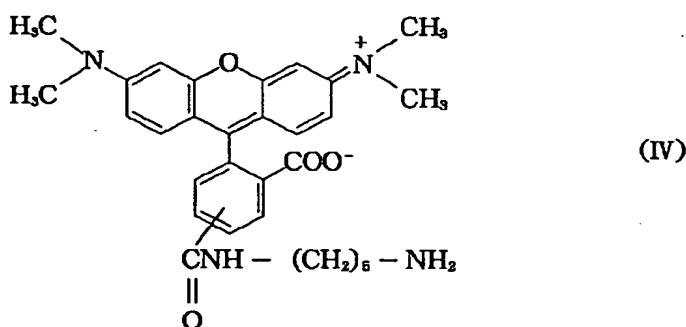
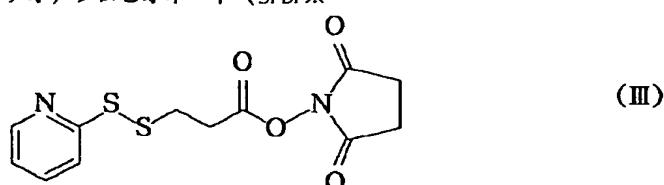
【0039】

【外5】

※ 化合物 I I I ) を結合し、その後、形成されたジスルフィド (-SS-) 結合を、例えば、ジチオスレイトールで切断しチオール化して用いることができる。アミノ基を結合した蛍光色素の例としては、5 (and 6) - [ {N-(5-アミノベンチル)アミノ}カルボニル]テトラメチルローダミン (テトラメチルローダミン カダベリン 化学式 I V ) をあげることができる。

【0041】

【外6】



【0042】一般的にプローブアレイにより標的物質を検出、特には定量する際には、アレイの中に対照領域を設けておき、そこに既知の濃度の標識モデルターゲットを作用させて、その標識物質からの信号を対照として、濃度未知の標的物質を定量する方法がしばしば用いられる。これと同様の目的で、あるいは絶対的なシグナル強度の標準として、本発明のマーキング方法によりマーキングした領域を用いることも可能である。

【0043】

【実施例】以下に実施例をあげて本発明を具体的に説明

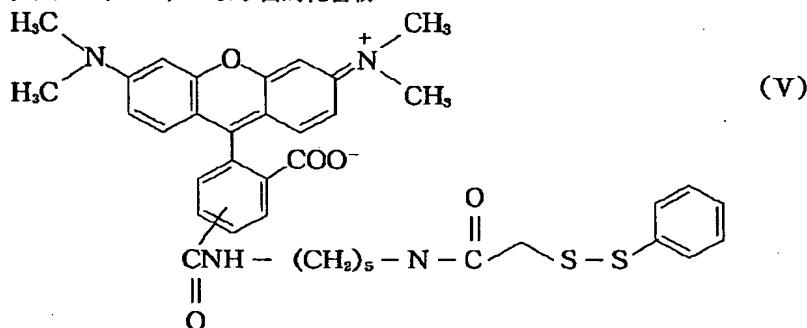
する。

【0044】(実施例1)

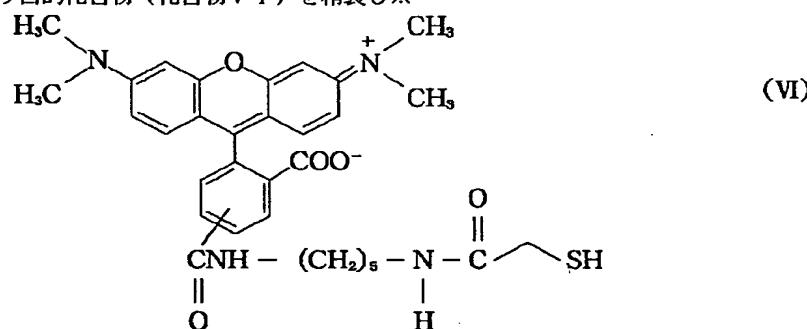
チオール基を有するマーカー物質の合成

反応容器に5 (and 6) - [ {N-(5-アミノベンチル)アミノ}カルボニル]テトラメチルローダミン (テトラメチルローダミン カダベリン 化合物 I V フナコシ葉品株式会社) 1 mg (1. 95 μmole) を採り、エタノール 0. 5 ml に溶解させた。ここに、別に 0. 5 ml のエタノールに溶解させた N-スクシイミジル-3-(2ビリジルジチオ)プロピオネート (SPDP 化合物 I

I I 株式会社同仁化学研究所)を1. 2 mg (3. 8 5 μmole)加え、室温下、攪拌しながら2時間反応させた。薄層クロマトグラフィーで反応を確認した後、シリカゲルクロマトグラフィー固相抽出管 (SUPELCO LC-SI シグマアルドリッヂャパン)により目的化合物\*



【0046】化合物V全量をエタノール0. 5 mlに溶解させ、ここに、0. 5 mlのエタノールに溶解したジチオスレイトール2 mg (過剰量)を加え、室温下、攪拌しながら2時間反応させた。薄層クロマトグラフィーで反応を確認した後、上記シリカゲルクロマトグラフィー固相抽出管により目的化合物 (化合物VI) を精製し※



#### 【0048】(実施例2)

##### 化合物VIの固相基板への結合

25. 4 mm × 25. 4 mm × 0. 5<sup>t</sup>の溶融石英基板を1%の超音波洗浄専用洗剤GP-I I (プランソン) 中で20分間超音波洗浄した後、水道水で超音波洗浄、流水洗浄を適宜行った。次に80°Cの1N NaCl中に20分間浸漬し、流水 (水道水) 洗浄、超純水超音波洗浄、流水 (超純水) 洗浄した。

【0049】減圧蒸留して精製したアミノシランカップリング剤 (KBM-603 化合物VII 信越化学工業株★

(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (VII)

【0051】冷却後、N-(6-マレイミドカプロキシ)スクシミド (EMCS 化合物I I) の0. 3%溶液 (エタノール:ジメチルスルホキシド=1:1)に基板を室温下、2時間浸漬し、反応させたのち、エタノール:ジメチルスルホキシド=1:1で1回、エタノールで3回洗浄し、窒素ガスを吹きつけて乾燥させた。

\* (化学式V)を精製した。このものはこれ以上の精製を行うことなく次の反応に用いた。

【0045】

【外7】

※た。原料が高価であること、収量、必要量共に少量であることから、化合物VIの合成の成否は実施例2における固相基板への結合の有無によって判断した。

20 【0047】

【外8】

★(会社)を1%の濃度で含む水溶液を室温下、1時間攪拌し、メトキシ基部分を加水分解させた。これはメーカーの指示する方法であって、シランカップリング剤の取り扱いにおいては一般的な方法である。次に上記基板を洗浄後速やかに上記シランカップリング剤水溶液に室温下、1時間浸漬し、流水 (超純水) 洗浄後、窒素ガスを吹きつけて乾燥させ、次いで、120°Cのオーブン中で1時間加熱定着させた。

【0050】

【0052】実施例1の化合物VIをサーマルジェットプリンターで吐出するための溶媒、すなわち、グリセリン7. 5 wt%、尿素7. 5 wt%、チオジグリコール7. 5 wt%、一般式Iで示されるアセチレンアルコール (例えば、商品名:アセチレノールEH 川研ファイブケミカル株式会社) 1 wt%を含む水溶液に、吸光度

19

が1.0になるように溶解させ、2mlをサーマルジェットプリンター(BJC-600J キヤノン株式会社)のインクタンクに充填し、上記の基板上に吐出した。なお、使用したBJC-600Jはガラス基板等に吐出可能なように改造を施したものである。装置の仕様上からは、吐出される液滴1滴の量は24plで、この条件では液滴1滴のしめるドットの直径は70~100μmである。吐出密度は120dpi(ドット/インチ)で、吐出した液滴の数は、 $50 \times 50 = 2500$ 個である。このように化合物VIの溶液を吐出した基板を、湿度100%の保湿チャンバー内に室温下で1時間反応させた後、流水(超純水)中で約30秒洗浄した。

【0053】次に、後に示すDNAアレイの検出と条件を同一とするために、上記基板をBSA(牛血清アルブミンシグマアルドリッヂャパン)を2%の濃度で含む50mMリン酸緩衝液(pH=7.0、1M NaClを含む)に1時間浸漬した後、上記緩衝液で適宜洗浄し、この状態でスライドグラス上に基板を置き、カバーガラスで覆って蛍光を観察した。使用した蛍光顕微鏡はECLIPSE E800(株式会社ニコン)に20倍対物レンズ(プランニアポクロマート)と蛍光フィルタ(Y-2E/C)をセットしたものである。また、画像の取得はイメージインテンシファイヤー付きCCDカメラ(C2400-87浜松ホトニクス株式会社)と画像処理装置(Argus50浜松ホトニクス株式会社)を用いて行った。

【0054】結果：サーマルヘッドで吐出した全てのドットから蛍光が観察された。蛍光強度の平均値はArgus5

20

0の感度設定HV=5.0 積算回数64回で1600であった。また、ドットの直径は平均で約70μmであった。対照実験として化合物VIの代わりに同じ基本骨格でチオール基をもたない化合物IVを用いて同様の実験を行ったところ、その蛍光強度の平均値は130であった。これによりチオール基を付与した蛍光色素をガラス基板表面に結合できることが確認された。

#### 【0055】実施例3

マーキングを施したDNAアレイ基板の作製とハイブリダイゼーション

実施例2の方法を用いてマーキングを施したDNAアレイ基板を作製した。DNAプローブの塩基配列と基板の作製方法を以下に述べる。

【0056】図1は本実施例で作製したDNAアレイ上のDNAプローブの塩基配列とその配置の概略を示したものである。即ち配列番号1の塩基配列を有する一本酸核酸を標的物質とし、該標的物質の塩基配列に対して完全相補鎖を有するプローブ、該標的物質の塩基配列に対し、1塩基ミスマッチ、2塩基ミスマッチ及び3塩基ミスマッチのプローブが各々基板上に配置されている。

【0057】配列番号1：“ATGAACCGGAAGG  
CCCATC”

【0058】そして各番号のプローブスポットには各々下記表1に示した様に各々の配列番号の塩基配列を有するプローブが配置されている。

#### 【0059】

【表1】

21

22

スポットNo.1:配列番号2	スポットNo.26:配列番号27	スポットNo.51:配列番号52
スポットNo.2:配列番号3	スポットNo.27:配列番号28	スポットNo.52:配列番号53
スポットNo.3:配列番号4	スポットNo.28:配列番号29	スポットNo.53:配列番号54
スポットNo.4:配列番号5	スポットNo.29:配列番号30	スポットNo.54:配列番号55
スポットNo.5:配列番号6	スポットNo.30:配列番号31	スポットNo.55:配列番号56
スポットNo.6:配列番号7	スポットNo.31:配列番号32	スポットNo.56:配列番号47
スポットNo.7:配列番号8	スポットNo.32:配列番号33	スポットNo.57:配列番号58
スポットNo.8:配列番号9	スポットNo.33:配列番号34	スポットNo.58:配列番号59
スポットNo.9:配列番号10	スポットNo.34:配列番号35	スポットNo.59:配列番号60
スポットNo.10:配列番号11	スポットNo.35:配列番号36	スポットNo.60:配列番号61
スポットNo.11:配列番号12	スポットNo.36:配列番号37	スポットNo.61:配列番号62
スポットNo.12:配列番号13	スポットNo.37:配列番号38	スポットNo.62:配列番号63
スポットNo.13:配列番号14	スポットNo.38:配列番号39	スポットNo.63:配列番号64
スポットNo.14:配列番号15	スポットNo.39:配列番号40	スポットNo.64:配列番号65
スポットNo.15:配列番号16	スポットNo.40:配列番号41	—
スポットNo.16:配列番号17	スポットNo.41:配列番号42	—
スポットNo.17:配列番号18	スポットNo.42:配列番号43	—
スポットNo.18:配列番号19	スポットNo.43:配列番号44	—
スポットNo.19:配列番号20	スポットNo.44:配列番号45	—
スポットNo.20:配列番号21	スポットNo.45:配列番号46	—
スポットNo.21:配列番号22	スポットNo.46:配列番号47	—
スポットNo.22:配列番号23	スポットNo.47:配列番号48	—
スポットNo.23:配列番号24	スポットNo.48:配列番号49	—
スポットNo.24:配列番号25	スポットNo.49:配列番号50	—
スポットNo.25:配列番号26	スポットNo.50:配列番号51	—

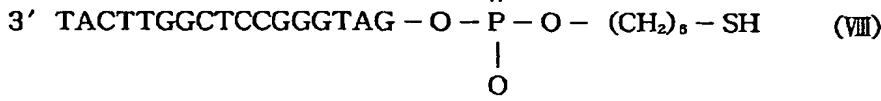
【0060】配列番号1は標的DNAの塩基配列、他の配列は配列番号1の塩基配列に対して相補的であるが、各配列番号に示した塩基配列の下線部を付した3つ塩基について、A、G、C、及びTのすべての組み合わせをもったもの、すなわち、 $4^3=64$ 通りの配列である。なお、上記プローブの3塩基は、上記配列番号1の塩基配列に付した下線部分に対応している。また図1に示した各プローブアレイの塩基配列のNの部分はそれぞれプローブアレイの上辺外側に記載したようにA、G、CまたはTに対応している。結果として、図1に示した基板上のスポットの内、No. 42が標的DNA配列に対して完全に相補的なプローブで構成され、またNo. 10、26、34、38、41、43、44、46及び58のスポットが標的DNA配列に対して1塩基ミスマッチのプローブで構成され、No. 2、6、9、11、12、14、18、22、25、27、28、30、33、35、3

6、37、39、40、45、47、48、50、54、57、59、60、及び62のスポットが標的DNA配列に対して2塩基ミスマッチのプローブで構成され、残りのスポットは標的DNA配列に対して3塩基ミスマッチのプローブで構成されるものとなる。

【0061】これらローダミン標識モデル標的DNAを含む65種のDNAはすべて、ベックス株式会社から購入した。なお、プローブDNAに関しては基板に結合するため5'端にチオールリンカーを担持させてある。チオールリンカーを有するDNAの例を化合物VIIIとしてあげた。ちなみに化合物VIIIはモデル標的DNAに対して完全に相補的な塩基配列(No.42)を有するものである。

【0062】

【外9】



【0063】これら64種類のDNAプローブと化合物V Iを実施例2と同様な方法により、ガラス基板上に吐出し反応させた。DNAプローブを吐出した際の濃度は1.5OD/2mIである。なお本実施例においては実際に1種類のDNAプローブからなるスポットは8×8=64個のドットから形成される様に構成し、64種のDNAプローブが形成する四角形の外周部に化合物V Iのドット101(1個所8個×32個所)を配置した(図2参照)。ドットの径、ピッチ等は実施例2に準ずる。基板は実施例2と同様に洗浄し、DNA等の表面への非特異的吸着を防止するためにBSAによるブロッキング処理を行い、ハイブリダイゼーションに用いるリン酸緩衝液(1.0 mM リン酸緩衝液 pH=7.0、5.0 mMのNaClを含む)で洗浄し、その後ハイブリダイゼーションを行った。

【0064】ハイブリダイゼーションは標的DNA(No.65)を5nMの濃度で含む上記緩衝液2mIを用い、ハイブリバック中で行った。基板を標的DNA溶液と共にハイブリバック中に封じ、恒温槽内で75°Cまで加熱し、その後、45°Cまで冷却し、その状態で10時間放置した。

【0065】次に、基板をハイブリバックから取り出し、ハイブリダイゼーション用の緩衝液で洗浄し、実施例2と同様の方法により蛍光を観察した。

【0066】結果：基板上の化合物V Iによるドットからは全ての位置において蛍光が観察された。その蛍光強度の平均値は3900(条件実施例2と同様、ただし、Argus50の感度設定 HV=2.0)であった。また、DNAプローブのドットの占める部分からは1種類のDNAプローブが形成する64個のドットから蛍光が観察された。その位置は上記の化合物V IによるドットからDNAプローブN 0.42であることが特定された。蛍光強度の平均値は1800(Argus50の感度設定 HV=5.0)であった。この結果から本発明によるマーキング方法がDNAプローブアレイを用いた標的DNAの検出、定量に有効であることが示された。また、本発明のマーキング方法によって得られるマーキング部位から得られる蛍光強度等の情報は、装置等の条件が一定であればほぼ一定であるので、これを標準の信号量として、サンプルからの信号量を補正することが可能であることも示された。

【0067】

【発明の効果】本発明により固相基板のマーキングが可能となった。また、本発明のマーキングを利用して、固相プローブアレイを用いての標的物質を、簡便に、信頼

性良く検出することが可能となった。

【0068】(配列リスト)

配列番号：1

10 配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

A T G A A C C G A G G C C C A T C

【0069】配列番号：2

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

G A T G G G A C T C A A G T T C A T

【0070】配列番号：3

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

G A T G G G A C T C A G G T T C A T

【0071】配列番号：4

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

G A T G G G A C T C A C G T T C A T

【0072】配列番号：5

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：他の核酸、合成DNA

25

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGACTCATGTTCAT

【0073】配列番号：6

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGACTCGAGGTTCAT

【0074】配列番号：7

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGACTCGGGGTTCAT

【0075】配列番号：8

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGACTCGCGGTTCAT

【0076】配列番号：9

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGACTCGTGTTCAT

【0077】配列番号：10

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGACTCCAGTTCAT

【0078】配列番号：11

配列の長さ：18

26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGACTCCGGTTCAT

【0079】配列番号：12

配列の長さ：18

10 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGACTCCCGTTCAT

【0080】配列番号：13

配列の長さ：18

配列の型：核酸

20 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGACTCCTGTTCAT

【0081】配列番号：14

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

30 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGACTCTAGTTTCAT

【0082】配列番号：15

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

40 配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGACTCTGGTTTCAT

【0083】配列番号：16

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

50 配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGACTCTCGTTCAT

【0084】配列番号：17

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGACTCTTGTTCAT

【0085】配列番号：18

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGGCTCAAGTTCAT

【0086】配列番号：19

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGGCTCAGGTTCAT

【0087】配列番号：20

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGGCTCACGTTCAT

【0088】配列番号：21

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGGCTCATGTTCAT

【0089】配列番号：22

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGGCTCGAGTTCAT

【0090】配列番号：23

配列の長さ：18

配列の型：核酸

10 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGGCTCGCGGTTCAT

【0091】配列番号：24

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

20 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGGCTCGCGGTTCAT

【0092】配列番号：25

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGGCTCGTGTTCAT

【0093】配列番号：26

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

40 配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGGCTCCAGTTCAT

【0094】配列番号：27

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

50 配列

29

GATGGGGCTCGCCGTTCAT

【0095】配列番号：28

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGGCTCCCGTTCA

【0096】配列番号：29

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGGCTCCTGTTCA

【0097】配列番号：30

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGGCTCTAGTTCA

【0098】配列番号：31

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGGCTTGGTTCA

【0099】配列番号：32

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGGCTTCGTTCA

【0100】配列番号：33

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

30

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGGCTTTTGTTCA

【0101】配列番号：34

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGCCTCAAGTTCA

【0102】配列番号：35

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

20 配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGCCTCAGGTTCA

【0103】配列番号：36

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

30 配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGCCTCACGTTCA

【0104】配列番号：37

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

40 配列

GATGGGCCTCATGTTCA

【0105】配列番号：38

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

50 GATGGGCCTCGAGTTCA

【0106】配列番号：39

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGCCTCGGGTTCAT

【0107】配列番号：40

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGCCTCGCGTTCAT

【0108】配列番号：41

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGCCTCGTGTTCAT

【0109】配列番号：42

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGCCTCCCAGTTCAT

【0110】配列番号：43

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGCCTCCCGGTTCAT

【0111】配列番号：44

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGCCTCCCGTTCAT

【0112】配列番号：45

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGCCTCCCTGTTCAT

【0113】配列番号：46

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

20 配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGCCTCTAGTTCAT

【0114】配列番号：47

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

30 配列

GATGGGCCTCTGGTTCAT

【0115】配列番号：48

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

40 GATGGGCCTCTCGTTCAT

【0116】配列番号：49

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGCCTCTTGTTCAT

50 【0117】配列番号：50

配列の長さ：18  
 配列の型：核酸  
 鎮の数：一本鎮  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸、合成DNA  
 配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列  
 配列  
 GATGGGTTCTCAAGTTCAT  
 【0118】配列番号：51  
 配列の長さ：18  
 配列の型：核酸  
 鎮の数：一本鎮  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸、合成DNA  
 配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列  
 配列  
 GATGGGTTCTCAGGTTCAT  
 【0119】配列番号：52  
 配列の長さ：18  
 配列の型：核酸  
 鎮の数：一本鎮  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸、合成DNA  
 配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列  
 配列  
 GATGGGTTCTCACGTTCAT  
 【0120】配列番号：53  
 配列の長さ：18  
 配列の型：核酸  
 鎮の数：一本鎮  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸、合成DNA  
 配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列  
 配列  
 GATGGGTTCTCATGTTCAT  
 【0121】配列番号：54  
 配列の長さ：18  
 配列の型：核酸  
 鎮の数：一本鎮  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸、合成DNA  
 配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列  
 配列  
 GATGGGTTCTCGAGTTCAT  
 【0122】配列番号：55  
 配列の長さ：18  
 配列の型：核酸  
 鎮の数：一本鎮  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸、合成DNA

(18) 34  
 配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列  
 配列  
 GATGGGTTCTCGGGTTCAT  
 【0123】配列番号：56  
 配列の長さ：18  
 配列の型：核酸  
 鎮の数：一本鎮  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸、合成DNA  
 10 配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列  
 配列  
 GATGGGTTCTCGCGTTCAT  
 【0124】配列番号：57  
 配列の長さ：18  
 配列の型：核酸  
 鎮の数：一本鎮  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸、合成DNA  
 配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列  
 20 配列  
 GATGGGTTCTCGTGTTCAT  
 【0125】配列番号：58  
 配列の長さ：18  
 配列の型：核酸  
 鎮の数：一本鎮  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸、合成DNA  
 配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列  
 30 配列  
 GATGGGTTCTCCCAGTTTCAT  
 【0126】配列番号：59  
 配列の長さ：18  
 配列の型：核酸  
 鎮の数：一本鎮  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸、合成DNA  
 配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列  
 配列  
 GATGGGTTCTCCCGTTCAT  
 40 【0127】配列番号：60  
 配列の長さ：18  
 配列の型：核酸  
 鎮の数：一本鎮  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸、合成DNA  
 配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列  
 配列  
 GATGGGTTCTCCCGTTCAT  
 【0128】配列番号：61  
 50 配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGTTCTCCGTTCAT

【0129】配列番号：62

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGTTCTCTAGTTCAT

【0130】配列番号：63

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGTTCTCTGGTTCAT

【0131】配列番号：64

\* 配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGTTCTCTCGTTTCAT

【0132】配列番号：65

10 配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

GATGGGTTCTCTTGTTTCAT

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2における標的DNA塩基配列とプローブ

20 塩基配列およびアレイ基板上の配置

【図2】実施例2における各DNAプローブ、もしくは、

マーキング物質のドットパターン図

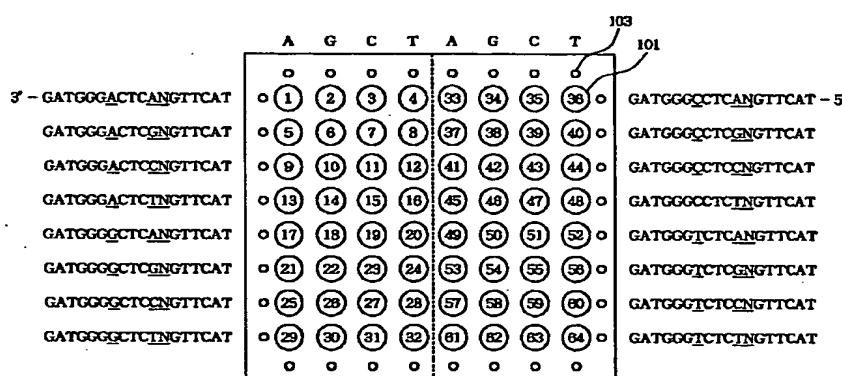
【符号の説明】

101 プローブスポット

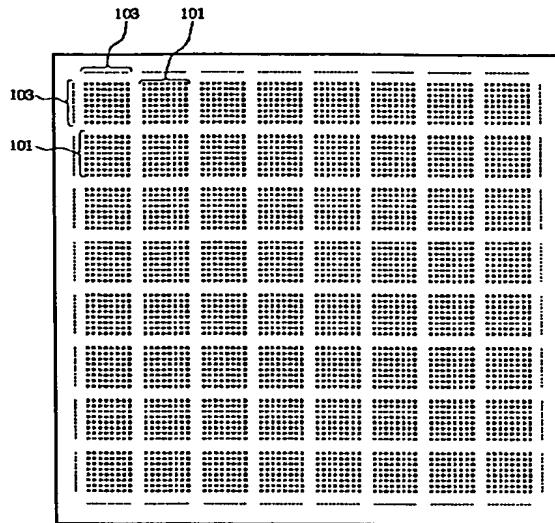
103 マーカー化合物スポット

\*

【図1】



【図2】



## 【手続補正書】

【提出日】平成12年4月20日(2000.4.20)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0090

【補正方法】変更

【補正内容】

【0090】配列番号：23

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

\* CATGGGGCTCCGGTTCAT

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正内容】

【0094】配列番号：27

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列の特徴：標的核酸検出用プローブ配列

配列

\* CATGGGGCTCCGGTTCAT

フロントページの続き

(72)発明者 鈴木 智博

東京都大田区下丸子3丁目30番2号キヤノン株式会社内

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 CA11

CA20 HA14 HA19

4B029 AA07 BB20 FA12

4B063 QA01 QA13 QQ42 QR32 QR35

QR41 QR46 QR48 QR51 QR56

QR63 QR66 QR84 QS02 QS34

QX02